



INVESTIGAÇÃO DOS MARCADORES DO METABOLISMO GLICOLÍTICO EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS SOB HIPÓXIA

Autores: LORENA DOS REIS PEREIRA QUEIROZ, AMANDA MARIA RIBEIRO, MARCELA GONÇALVES DE SOUZA, SABRINA FERREIRA DE JESUS, LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS, ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, ELOÁ MANGABEIRA SANTOS,

Introdução

O carcinoma de células escamosas orais (OSCC) é o quarto tipo de neoplasia de maior incidência, sendo o mais comum da cavidade oral (FERLAY *et al.* 2015). Células neoplásicas possuem metabolismo exclusivo por glicólise aeróbica que tem como produto final o piruvato, encontrado em células neoplásicas e sendo convertido em lactato, independente da presença de oxigênio, fenômeno conhecido como efeito Warburg (WARBURG, 1956). A piruvato desidrogenase (PDH), quando ativada, pode mudar o metabolismo das células neoplásicas da glicólise para a oxidação da glicose, havendo diminuição na produção de lactato, aumentando as espécies reativas de oxigênio associadas à indução da apoptose e redução da proliferação celular, com a hipóxia sendo a principal responsável pelo fluxo glicolítico anormal em células cancerosas (SUN *et al.* 2015). Essas condições hipóxicas protegem as células dos efeitos letais das radiações ionizantes interferindo no processo de duplicação do DNA (JHAM; ARS, 2006). Segundo Mottram (1936), a radiorresistência de algumas neoplasias é devido à presença de células tumorais hipóxicas. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito da radiação imediata e após 24 horas de radiação em genes relacionados ao metabolismo glicolítico em OSCC.

Material e métodos

A aprovação ética para este estudo foi obtida junto do Conselho de Revisão Institucional (número do processo CAAE 52760016.9.0000.5146) e o formulário de consentimento informado assinado foi obtido de todos os pacientes. Amostras de oito pacientes com OSCC e sete amostras de sangue de pacientes com controle foram inscritas no presente estudo para medir as diferenças nos níveis da PDH no mRNA.

Para simular condições hipóxicas, as células SCC9 foram cultivadas em meios com a adição de 100 μ M de cloreto de cobalto (CoCl₂, Sigma, St. Louis, MO, EUA). Todas as experiências culturais foram realizadas em triplicado.

O raio de raios X de GAMMATRON-S80, fonte CO-60 GK 60T03 foi utilizado para esses estudos. As células foram irradiadas usando a técnica de isocêntrico com o acelerador linear posicionado na base da célula aderida. O efeito da irradiação nas células SCC9 foi avaliado em todos os ensaios de duas maneiras: imediatamente após a radiação e 24 horas após a radiação.

O RNA foi isolado usando o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com o fabricante, utilizando a técnica de qRT-PCR.

A detecção de células apoptóticas foi realizada por coloração simultânea com Laranja de Acridina (AO) (AO, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e Brometo de Etídio (EB) (EB, Sigma, St. Louis, MO, EUA). A coloração intensa EB (Ex360-370, Em420-460, filtro DM400) indica morte celular, enquanto o AO extremo (Ex460-495, Em510-550, filtro DM505) indica células vivas.

As análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS (Versão 18.0) e GraphPad Prism (Versão 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram realizados para avaliar a distribuição de dados. O significado estatístico foi aceito em $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Foi constatado aumento dos níveis de mRNA de PDH em pacientes com OSCC após a RT em comparação com pacientes sem OSCC (Fig. 1). A razão Lactato desidrogenase (LDH)/Piruvato desidrogenase demonstrou que tanto em células tratadas com CoCl₂ quanto nas tratadas com radiação + CoCl₂ aumentou os níveis de lactato sob efeito de radiação imediata (Fig. 2A). Além disso, após 24 horas, foi possível observar um aumento nos níveis de lactato na linhagem celular SCC9 tratada com CoCl₂ e que o efeito da radiação, isoladamente, diminuiu os níveis de lactato e aumentou os níveis de piruvato (Fig. 2B). Além disso, o ensaio de morte celular com laranja de acridina e brometo de etídio revelou que a radiação aumentou o número de corpos apoptóticos em comparação com o grupo controle, mesmo em condições hipóxicas (Fig. 3A-B).

De acordo com este estudo, foi possível observar, após 24 horas de radiação, uma diminuição nos níveis de lactato pela relação LDH/PDH. Um estudo anterior também mostrou que, 24 horas após a radiação, há uma redução da relação lactato/piruvato (SAITO *et al.* 2015). Nas células de carcinoma de células escamosas (SCCVII), a expressão da relação lactato/piruvato foi menor no grupo irradiado em comparação com o grupo controle.

A eficácia da radioterapia depende de vários fatores, como o mecanismo de oxigenação das células neoplásicas. Sabe-se que o carcinoma de células escamosas é marcado por tumores hipóxicos e o aumento da razão lactato/piruvato é uma consequência do crescimento tumoral, uma vez que o aumento da enzima LDH pode ser desencadeado pelo Fator Indutor de Hipóxia 1-alfa (HIF-1 α) (SAITO *et al.* 2015), conforme encontrado em nosso resultado da hipóxia induzida nas SCC9 por CoCl₂.

O tratamento mais comum usado para câncer além da cirurgia é a radiação ionizante (IR), que favorece a produção de radicais livres em níveis elevados (DONG *et al.* 2016). A IR atua direta e indiretamente. No efeito direto, a energia da radiação e as espécies reativas de oxigênio produzidas a partir de água intercelular promove uma ruptura na cadeia dupla do DNA. O efeito indireto, por outro lado, é considerado uma resposta secundária que está envolvida na expressão gênica e sinalização celular por Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (WANG; YI, 2008). A terapia de radiação está relacionada à ativação e estabilização do HIF-1 α , que pode desencadear a ativação e a transcrição de vários genes envolvidos na angiogênese, na proliferação e metabolismo glicolítico. O HIF-1 α pode ativar a enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK) por inativação da piruvato desidrogenase e, conseqüentemente, impede que o piruvato entre no ciclo de Krebs. A estabilização de HIF-1 α induzida por IR melhora a glicólise em células de câncer (YANG *et al.* 2013) e a hipóxia influencia as células neoplásicas de duas maneiras: prejudicando ou atenuando mecanismos como proliferação, apoptose e necrose ou atuando como um fator que melhora a progressão maligna e aumento da resistência à radioterapia (VAUPEL; HARRISON, 2004).

Conclusão

Em conclusão, a radiação sob hipóxia aumenta os níveis de PDH em pacientes. Além disso, a radiação aumentou o número de células apoptóticas em comparação com o grupo controle, mas o efeito imediato da radiação atua ao aumentar os níveis de LDH.

Agradecimentos

Este trabalho foi possível devido ao apoio dos órgãos de fomento FAPEMIG e CNPq.

Referências Bibliográficas

- DONG, G; CHEN, Q; JIANG, F; YU, D; MAO, Q; XIA, W. *et al.* Diisopropylamine dichloroacetate enhances radiosensitization in esophageal squamous cell carcinoma by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species levels. **Oncotarget**. v. 7, n. 42, p. 68170-68178, set, 2016.
- FERLAY, J; Soerjomataram, I; Dikshit, R; Eser, S; Mathers, C; Rebelo, M. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**. v. 136, n. 5, p. 359-86, mar, 2015.
- JHAM, B.C; ARS, F. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. **Rev Bras Otorrinolaringol**. v. 72, n. 5, p. 704-8, set/out, 2006.
- MOTTRAM, J.C. A Factor of Importance in the Radio Sensitivity of Tumours. **The British Journal of Radiology**. v. 9, n. 105, p. 606-14, 1936.
- SAITO, K; MATSUMOTO, S; TAKAKUSAGI, Y; MATSUO, M; MORRIS, H.D; LIZAK, M.J. *et al.* 13C-MR Spectroscopic Imaging with Hyperpolarized [1-13C]pyruvate Detects Early Response to Radiotherapy in SCC Tumors and HT-29 Tumors. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**. v. 21, n. 22, p. 5073-81, nov, 2015.
- SUN, X.R; SUN, Z; ZHU, Z; GUAN, H.X; Li, C.Y; ZHANG, J.Y. *et al.* Expression of pyruvate dehydrogenase is an independent prognostic marker in gastric cancer. **World journal of gastroenterology**. v. 21, n. 17, p. 5336-44, mai, 2015.
- VAUPEL, P; HARRISON, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. **The oncologist**. v. 9, n. 5, p. 4-9, 2004.
- WANG, J; YI, J. Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. **Cancer biology & therapy**. v. 7, n. 12, p. 1875-84, dez, 2008.
- WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**. v. 123, n. 3191, p. 309-14, fev, 1956.
- YANG, Y; SUN, M; WANG, L; Jiao, B. HIFs, angiogenesis, and cancer. **Journal of cellular biochemistry**. v. 114, n. 5, p. 967-74, mai, 2013.

Expressão PDH em pacientes

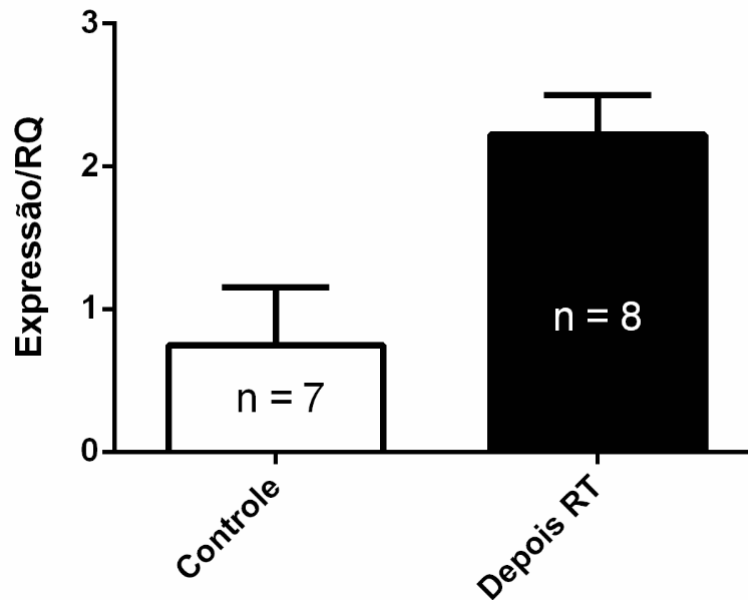


Figura 1: Os níveis de mRNA de PDH (piruvato desidrogenase) aumentaram após a radiação em comparação com o controle.

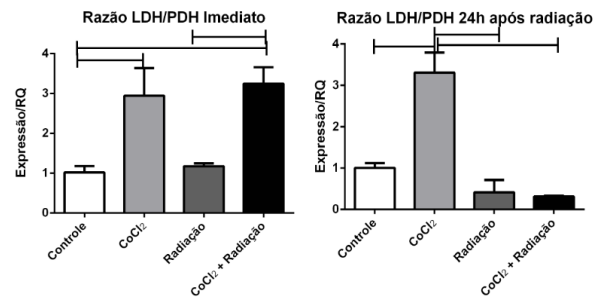


Figura 2: (A) O tratamento de células SCC9 com CoCl₂(Cloro de Cobalto) e CoCl₂ + radiação aumenta o lactato sob efeito de radiação imediata. (B) Após 24 horas, CoCl₂ aumenta o lactato e a radiação diminui o lactato.

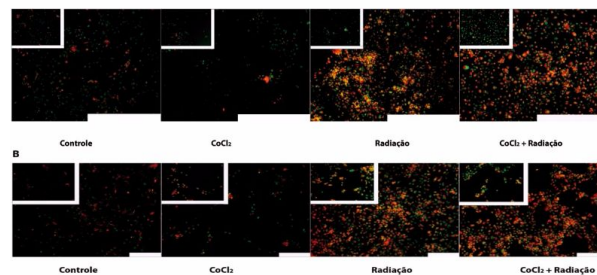


Figura 3: A quantificação AO(laranja de acridina)/EB(brometo de etídio) (A e B) mostra um aumento na morte celular como consequência da radiação. A escala é de 100µm.